

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **09255561 A**

(43) Date of publication of application: **30.09.97**

(51) Int. Cl.

A61K 9/107

A61M 37/00

A61N 1/30

(21) Application number: **08096180**

(22) Date of filing: **28.03.98**

(71) Applicant: **HISAMITSU PHARMACEUT CO
INC**

(72) Inventor: **MORI KENJI
ADACHI HIROTOSHI
MORIMOTO KAZUTOSHI
SUGIBAYASHI KENJI**

**(54) MICROEMULSION PREPARATION FOR
ELECTROPORATION**

(57) Abstract

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a microemulsion preparation synergistically raised in medicinal delivery effect.

SOLUTION: This microemulsion preparation is intended to increase medicinal absorption vivo through its administration to electroporation-applied site(s). The microemulsion comprises an aqueous phase (e.g. water, buffer solution), oily phase (e.g. soybean oil, fatty

acid triglyceride), surfactant (e.g. polyoxyethylene hydrogenated castor oil) and a medicinal agent. The particle size for the microemulsion is such that $\approx 90\%$ of the total particles falls within the range from 0.1 to 100nm in size. This microemulsion preparation stands integrated with electrodes for electroporation. Electroporation develops fine holes serving as transmission route in the skin of mucous membrane, through which the medicinal agent encapsulated in the readily absorbable microemulsion fine particles are absorbed; thus yielding higher medicinal virtues.

COPYRIGHT: (C)1997,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-255561

(43) 公開日 平成9年(1997)9月30日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 9/107			A 6 1 K 9/107	C
A 6 1 M 37/00			A 6 1 M 37/00	
A 6 1 N 1/30			A 6 1 N 1/30	

審査請求 未請求 請求項の数7 F D (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願平8-96180

(22) 出願日 平成8年(1996)3月26日

(71) 出願人 000160522

久光製薬株式会社

佐賀県鳥栖市田代大官町408番地

(72) 発明者 森 健二

茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 久

光製薬株式会社筑波研究所内

(72) 発明者 安達 博敏

茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 久

光製薬株式会社筑波研究所内

(72) 発明者 森本 雅憲

埼玉県坂戸市西坂戸4丁目7番22号

(72) 発明者 杉林 堅次

埼玉県坂戸市西坂戸4丁目9番22号

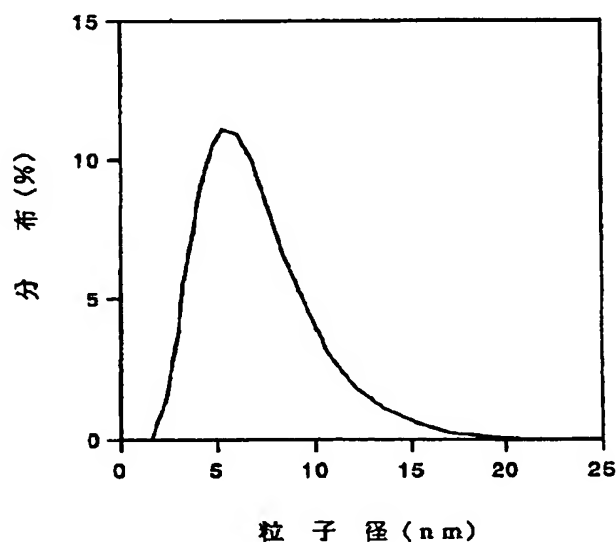
(74) 代理人 弁理士 加茂 裕邦

(54) 【発明の名称】 エレクトロポレーション用マイクロエマルジョン製剤

(57) 【要約】

【課題】 マイクロエマルジョンに封入した薬物をエレクトロポレーションにより吸収させることにより、従来技術に比べ高い薬効を得る。

【解決手段】 エレクトロポレーション用マイクロエマルジョン製剤であつて、マイクロエマルジョンが水相、油相、界面活性剤及び薬物を含有してなることを特徴とするエレクトロポレーション用マイクロエマルジョン製剤。



1

【特許請求の範囲】

【請求項1】エレクトロポレーション用のマイクロエマルジョン製剤であって、マイクロエマルジョンが水相、油相、界面活性剤及び薬物を含有してなることを特徴とするエレクトロポレーション用マイクロエマルジョン製剤。

【請求項2】上記マイクロエマルジョンの粒子径が0.1nm～100nmの範囲に90%以上の粒度分布を有するマイクロエマルジョンである請求項1記載のエレクトロポレーション用マイクロエマルジョン製剤。

【請求項3】上記マイクロエマルジョンの粒子径が0.1nm～50nmの範囲に90%以上の粒度分布を有するマイクロエマルジョンである請求項1記載のエレクトロポレーション用マイクロエマルジョン製剤。

【請求項4】上記マイクロエマルジョンの水相が水、緩衝液及び塩の水溶液より選択される水相である請求項1、2又は3記載のエレクトロポレーション用マイクロエマルジョン製剤。

【請求項5】上記マイクロエマルジョンの油相が、植物油、動物油、飽和脂肪酸エステル、不飽和脂肪酸エステル及び中鎖脂肪酸エステルより選択される油相である請求項1、2又は3記載のエレクトロポレーション用マイクロエマルジョン製剤。

【請求項6】上記マイクロエマルジョンの界面活性剤がHLB3～7の界面活性剤とイオン性界面活性剤を混合してなるか又はHLB3～7の界面活性剤とHLB10～20の界面活性剤を混合してなる界面活性剤である請求項1、2又は3記載のエレクトロポレーション用マイクロエマルジョン製剤。

【請求項7】上記マイクロエマルジョンの薬物が水相に含有されてなるマイクロエマルジョンである請求項1、2、3、4、5又は6記載のエレクトロポレーション用マイクロエマルジョン製剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は医療の分野において使用されるエレクトロポレーション用マイクロエマルジョン製剤に関し、より詳しくはエレクトロポレーションとマイクロエマルジョンとを併用することにより薬物や生理活性物質を生体内へ投与する方法において使用するエレクトロポレーション用マイクロエマルジョン製剤に関する。

【0002】

【従来の技術】エレクトロポレーションは、従来遺伝子の導入に用いられていた方法であり、細胞に対して瞬時に高電圧を負荷し、細胞内へのDNA等を導入させる方法である。近年、この技術を経皮、経粘膜からの薬物の送達に応用することが試みられている〔特表平3-502416号、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:10504-10508 (199

2

3)〕。エレクトロポレーションにおいては皮膚や粘膜に対して新たな可逆的なルートである孔を形成し、この孔を薬物の送達に利用するが、エレクトロポレーションの単独利用では十分な量の薬物を送達することはできなかった。

10

【0003】一方、マイクロエマルジョンは1943年にHoar等により初めて得られたもので、粒子径が著しく小さい澄明な液体である。近年、消化管からの吸収が悪いペプチドなどをこのマイクロエマルジョンに封入し、その吸収を促進させる方法が研究されている（特開平7-2689号）。マイクロエマルジョンは数nm～数百nm（nm＝ナノメートル）の径を持つ安定粒子で、その中に薬物を封入することができる薬物キャリアーである。これによれば皮膚や粘膜を通してある程度の吸収促進効果を有するが、吸収させようとする皮膚や粘膜に孔がなければ吸収されず、皮膚や粘膜から十分な量の薬物を吸収させるには至っていない。

20

【0004】このように皮膚や粘膜から薬物を送達する場合、エレクトロポレーション単独やマイクロエマルジョン単独では皮膚や粘膜からの薬物の透過が不十分であり、十分な薬効を得ることはできなかった。本発明者は従来技術におけるこのような事情、問題点に鑑み、各種多方面から実験、検討を進めたところ、薬物や生理活性物質（本明細書中、両者を合わせて適宜「薬物」と指称する）をマイクロエマルジョンに封入する一方、エレクトロポレーションにより皮膚や粘膜に可逆的な孔を形成し、その孔からマイクロエマルジョンを送達することにより生体内に薬物を有効に送達する新規且つ有用な方法を見い出した。

30

【0005】

【発明が解決しようとする課題】すなわち、本発明はエレクトロポレーションとマイクロエマルジョンとを併用するに際して使用するエレクトロポレーション用のマイクロエマルジョン製剤を提供することを目的とし、これによりエレクトロポレーション又はマイクロエマルジョンをそれぞれ単独に適用する場合に比べて薬物の送達効果を相乗的に増大させることができる。

【0006】

40

【課題を解決するための手段】本発明は、エレクトロポレーション用のマイクロエマルジョン製剤であって、マイクロエマルジョンが水相、油相、界面活性剤及び薬物を含有してなるエレクトロポレーション用マイクロエマルジョン製剤を提供する。

【0007】

50

【発明の実施の形態】エレクトロポレーションにおいては皮膚や粘膜に対して孔を形成するが、これだけでは皮膚や粘膜透過性の低い薬物に対して透過促進効果が望めず、充分な量を送達することができない。本発明においてはエレクトロポレーションを適用した部位にマイクロエマルジョン製剤を投与することにより体内への薬物の

吸収を格段に増大させるものである。本発明に係るマイクロエマルジョン製剤の粒子径は、好ましくは0.1nm~100nmの範囲に90%以上の粒度分布を有し、さらに好ましくは粒子径が0.1nm~50nmの範囲に90%以上の粒度分布を有する。

【0008】すなわち、その粒子径は、大きすぎてもエレクトロポレーションにより形成された孔を透過することができず、逆に小さすぎるとエレクトロポレーションに適したマイクロエマルジョン化ができないか、或いはマイクロエマルジョン化していない可能性がある。エレクトロポレーションにより形成される孔のサイズは、適用電圧、適用部位等の如何により異なるが、可逆的に形成される孔径は最大100nm程度と考えられる。このためマイクロエマルジョンの粒子径は0.1~100nm程度であるのが好ましい。また比較的電気刺激の少ない条件下においては形成される孔はさらに小さくなるため、この場合にはマイクロエマルジョンの粒子径は0.1~50nm程度であるのが好ましい。

【0009】本発明のエレクトロポレーション用マイクロエマルジョン製剤の適用態様としては、(1)皮膚や粘膜に対して少なくとも1回エレクトロポレーションを適用した後、その部位にマイクロエマルジョン製剤を適用して薬物を吸収させる、(2)皮膚や粘膜に対してマイクロエマルジョン製剤を適用した後、同じ部位に少なくとも1回エレクトロポレーションを適用して薬物を吸収させる、(3)マイクロエマルジョンをエレクトロポレーション用の電極と一体とした製剤とし、エレクトロポレーションとマイクロエマルジョンを同時に適用する等の各種手法により実施することができる。これら

(1)~(3)のいずれの態様の場合にも、その後経時的に何回エレクトロポレーションを適用しても差し支えない。

【0010】図1は、そのような適用態様のうち特に

(1)~(2)の態様において使用され得るエレクトロポレーション用電極の一例を示す図である。図1中、1は絶縁性高分子フィルム、2は一对の電極であり、図示のとおり両電極間には複数の細線が交互に間隔を置いて配置されている。その細線の間隔は、一例として図1中拡大図で示すとおり、例えば0.2mm程度である。本電極の使用に際してはその電極面を皮膚や粘膜に当接させた後、電極間に以下に述べるような電力がかけられる。

【0011】本発明の製剤を適用するエレクトロポレーション用の電極としては分極性、非分極性のいずれでもよい。また電圧としては10~2000V/cmの範囲で適用でき、皮膚に対する電気刺激を考慮すると好ましくは50~1000V/cmの範囲で適用される。通電パターンとしては特に限定はないが、指数対数型波か矩形型波であるのが好ましい。エレクトロポレーションは1回以上通電すれば効果は見られるが、回数が多いほど

その効果は増加する。通電時間は電気刺激感を考慮して指数対数型波の場合は τ 値として0.1 μ 秒~5秒(τ は適用して電圧が約37%に減衰するまでの時間)、矩形波の場合には0.1 μ 秒~100m秒程度であるのが望ましい。

【0012】本発明に係るエレクトロポレーション用マイクロエマルジョン製剤の適用形態としては、皮膚や粘膜に対してマイクロエマルジョンを多孔質膜へ含浸させた形で貼付するか、或いは液状のままで乳剤やローション剤のようにして塗布してもよく、さらに図2に示すようにマイクロエマルジョンをエレクトロポレーション用の電極と一体とした製剤としてもよい。この電極一体型製剤は前記適用態様(1)~(3)のうち特に(3)の態様で適用する場合に好適に用いられる。

【0013】図2中、3は電極、4は粘着層、5はマイクロエマルジョン保持層である。このマイクロエマルジョン保持層5としては不織布や各種高分子を材料とする膜(例えば6, 6-ナイロン、セルロース、セルロースアセテート、ポリフッ化ビニリデン等)を用いることができ、或いはゼラチン、寒天、ポリビニルアルコールゲル、ポリアクリル酸ナトリウム、カルボキシルメチルセルロースナトリウムその他の高分子ゲルを使用してもよい。これら保持層中に本発明のマイクロエマルジョンが収容され保持される。

【0014】本発明におけるマイクロエマルジョンは、水相、油相及び数種類の界面活性剤を含有して構成される。界面活性剤の種類としてはHLBが3~7の非イオン性界面活性剤とイオン性界面活性剤とを組み合わせる用いるか、またはHLBが3~7の非イオン性界面活性剤とHLBが10~20の非イオン性界面活性剤とを組み合わせる使用とする。それら各成分の配合割合としては、水相については0.0001~30%(重量%、以下同じ)、好ましくは1~20%、さらに好ましくは5~15%の範囲であり、界面活性剤は0.0001~20%の範囲、また油性成分については50~99%の範囲で使用される。

【0015】上記水相としては特に限定はないが、好ましくは①水、②リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液、炭酸緩衝液、酢酸緩衝液などの緩衝液、③塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫酸ナトリウム等の塩類を含む水溶液を挙げることができ、これらに薬物を溶解させる。また油相としては特に限定はないが、好ましくは大豆油、胡麻油、オリーブ油のような植物油、或いは動物性食用油(脂肪酸グリセリンエステル類)、飽和又は不飽和脂肪酸、中鎖脂肪酸(C5~C18)のモノ、ジ、トリグリセリンエステル類等を挙げることができる。

【0016】また上記イオン性界面活性剤としては特に限定はないが、例えばジ-2-エチルヘキシルコハク酸ナトリウム、アルキル硫酸ナトリウム(アルキル部分がC8~C20、好ましくはC10~C14)等が挙げられる。

またHLBが10~20の非イオン性界面活性剤としてはポリオキシエチレン硬化又は非硬化ヒマシ油（ポリオキシエチレン平均付加モル数が30~80）、ポリオキシエチレングリコール高級脂肪酸エステル（脂肪酸が飽和又は不飽和のC₁₆~C₂₀の脂肪酸であり、エチレングリコールの平均の付加モル数が10~40）、ポリオキシエチレンアルキルエーテル（アルキル部分がC₈~C₁₄であり、オキシエチレン平均付加モル数が4~25）等が挙げられる。

【0017】また、HLBが3~7の非イオン性界面活性剤としては、モノ又はポリグリセリン脂肪酸エステル（脂肪酸が飽和又は不飽和のC₁₈~C₂₀の脂肪酸であり、グリセリン1モル当たりの脂肪酸付加モル数が1~2であり、さらにグリセリンの付加モル数が0~4）、ソルビタン脂肪酸エステル（脂肪酸が不飽和のC₁₆~C₂₀であり、その付加モル数が1~3）、ポリオキシエチレン硬化又は非硬化ヒマシ油（オキシエチレン平均付加モル数が3~20）等が挙げられる。

【0018】さらに本発明の製剤において用いられる薬物としては、例えばモルヒネ、フェンタニル、ペチジン、コデイン、ブプレノフィン、ブトルファノール、エプタゾシン、ペンタゾシンなどの中樞性鎮痛薬やインスリン、カルシトニン、カルシトニン関連遺伝子ペプチド、パソプレッシン、デスマプレッシン、プロチレリン（TRH）、副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）、黄体形成ホルモン放出因子（LH-RH）、成長ホルモン放出ホルモン（GRH）、神経成長因子（NGF）及びその他の放出因子、アンジオテンシン（アンジオテンシン）、副甲状腺ホルモン（PTH）、甲状腺刺激ホルモン（TSH、サイロトロピン）、卵胞刺激ホルモン（FSH）、黄体形成ホルモン（LH）、プロラクチン、血清性腺刺激ホルモン、胎盤性性腺刺激ホルモン（HCG）、下垂体性性腺刺激ホルモン（HMG）、成長ホルモン、ソマトスタチン、ソマトメジン、グルカゴン、オキシトシン、ガストリン、セクレチン、エンドルフィン、エンケファリン、コレストキニン、エンドセリン、ニューロテンシン、インターフェロン、インターロイキン、トランスフェリン、エリスロポエチン、スーパーオキシサイドデスムターゼ（SOD）、顆粒球刺激因子（G-CSF）、腸管血管拡張ペプチド（VIP）、ムラミルジペプチド、コルチコトロピン、ウロガストロン、ヒト心房性利尿ペプチド（h-ANP）等のペプチド類、カルマバゼピン、クロルプロマジン、ジアゼパム、ニトラゼパム等の精神安定薬、プレオマイシン、アドレマイシン、5-フルオロウラシル、マイトマイシン等の抗悪性腫瘍薬、ジギタリス、ジゴキシン、ジギトキシン等の強心症薬、レセルピン、クロニジン等血圧降下剤、エストラジオール、テストステロン等の性ホルモン等が挙げられるが、これらに限らず、経皮や経粘膜により送達できるものであれば用いられる。

【0019】

【実施例】以下、実験例1~実験例3に基づき本発明の実施例を説明するが、本発明がこれら実施例によって限定されないことは勿論である。実験例1においては、サーモンカルシトニン（sCT）の投与を例にして、エレクトロポレーションとマイクロエマルジョンの併用効果とエレクトロポレーション単独又はマイクロエマルジョン単独の効果とを比較した。また実験例2においては、平均粒子径が5.9nmのマイクロエマルジョンにsCTを封入した場合と4.3μmのエマルジョンにsCTを封入した場合との薬効を調べた。さらに実験例3においては種々の薬物とマイクロエマルジョンを組み合わせた処方と製剤の例及びそのときのマイクロエマルジョンの平均粒子径を示した。

【0020】〔実験例1〕

《実施例1-1》エレクトロポレーションとマイクロエマルジョンの併用によるsCTの投与（1）

〈マイクロエマルジョンの調製〉サーモンカルシトニン（sCT、NOVA）1mgを牛血清アルブミン（1%BSA）の水溶液50μlに溶解させてsCT溶液を調製した。一方、スルホコハク酸型アニオン界面活性剤（ベレックスOTP、花王社製、商品名）140mgにジグリセリンモノオレイン酸エステル（DGMO、日光ケミカル社製、商品名）100mg及び中鎖脂肪酸トリグリセライド（バナセート810、日本油脂社製、商品名）1760mgを混合し界面活性剤油液を調製した。こうして得たsCT溶液20μlと界面活性剤油液980μlを混合しsCT封入マイクロエマルジョンを調製した。マイクロエマルジョンの粒子径をレーザー光散乱法（使用装置=レーザー光散乱粒度分布測定装置、大塚電子社製DLS-7000型、Arレーザー出力75mW、以下同じ）により測定した。

【0021】〈吸収実験〉SDラットをウレタン麻酔下、バリカンとシェイバーにより腹部除毛後、腹部に生理食塩水200μlを滴下し、図1に示す電極を使用して2回通電（1KV/cm、25μFD）した。通電後、直ちに生理食塩水を拭き取り、上記のとおり調製したsCT封入マイクロエマルジョンの200μlを該腹部に適用した。マイクロエマルジョンの適用後、経時的に頸静脈から採血し、遠心分離して血清を得た。次いで、市販のカルシウム測定キット（カルシウムCテストワコー、和光純薬社製、商品名）を用いて吸光度法（UV:570nm）により血清中のカルシウム濃度を測定し、薬物投与前の血清中のカルシウム濃度と比較した。

【0022】《実施例1-2》エレクトロポレーションとマイクロエマルジョンの併用によるsCTの投与（2）

〈マイクロエマルジョンの調製〉サーモンカルシトニン（sCT、NOVA）1mgを牛血清アルブミンを含むpH3のクエン酸緩衝液（1%BSA/CB緩衝液）5

0 μ l に溶解させ sCT 溶液を調製した。一方、ポリオキシエチレン（平均付加モル数=20）モノオレイン酸ソルビタン（日光ケミカル社製）80mg にジグリセリンモノオレイン酸エステル（DGM O、日光ケミカル社製、商品名）160mg 及び中鎖脂肪酸トリグリセライド（パナセート 810、日本油脂社製、商品名）1760mg を混合して界面活性剤油液を調製した。こうして得た sCT 溶液 20 μ l と界面活性剤油液 980 μ l を混合して sCT 封入マイクロエマルジョンを調製した。このマイクロエマルジョンの粒子径をレーザー光散乱法により測定したところ、平均粒子径 30.5 nm であった。

【0023】〈吸収実験〉SD ラットをウレタン麻酔下、バリカンとシェイバーにより腹部除毛後、腹部に生理食塩水 200 μ l を滴下し、図 1 に示す電極を使用して 2 回通電（1KV/cm、25 μ FD）した。通電後、直ちに生理食塩水を拭き取り、上記 sCT 封入マイクロエマルジョンの 200 μ l を該腹部に適用した。マイクロエマルジョンの適用後、経時的に頸静脈から採血し、遠心分離して血清を得た。次いで、市販のカルシウム測定キット（カルシウム C テストワコー、和光純薬社製、商品名）を用いて吸光度法（UV：570 nm）により血清中のカルシウム濃度を測定し、薬物投与前の血清中のカルシウム濃度と比較した。

【0024】《比較例 1-1》マイクロエマルジョンによる sCT の投与

〈吸収実験〉SD ラットをウレタン麻酔下、バリカンとシェイバーにより腹部除毛後、腹部に生理食塩水 200 μ l を滴下し、直ちに生理食塩水を拭き取り、実施例 1-1 で調製した sCT 封入マイクロエマルジョン 200 μ l を該腹部に適用した。マイクロエマルジョン適用後、経時的に頸静脈から採血し、遠心分離して血清を得た。血清中のカルシウム濃度の測定を実施例 1-1 ~ 実施例 1-2 と同様に行った。

【0025】《比較例 1-2》エレクトロポレーションによる sCT の投与

〈sCT 溶液の調製〉サーモンカルシトニン（sCT、NOVA）1mg を牛血清アルブミン（1%BSA）の水溶液 50 μ l に溶解させて sCT 溶液を調製した。これら sCT 溶液 20 μ l と 1%BSA 溶液 980 μ l とを混合して sCT 溶液を調製した。

〈吸収実験〉SD ラットをウレタン麻酔下、バリカンとシェイバーにより腹部除毛後、腹部に生理食塩水 200 μ l を滴下し、図 1 に示す電極を使用して 2 回通電（1KV/cm、25 μ FD）した。通電後直ちに生理食塩水を拭き取り、sCT 溶液を 200 μ l を腹部に適用した。投与後、経時的に頸静脈から採血し、遠心分離して血清を得た。血清中のカルシウム濃度の測定を実施例 1-1 ~ 実施例 1-2 と同様に行った。

【0026】〈試験結果〉図 3 は実施例 1-1 で調製し

たマイクロエマルジョンの粒度分布を示す図である。前記のとおり比較例 1-1 でも同じマイクロエマルジョンを使用している。図 3 のとおり実施例 1-1 及び比較例 1-1 で用いたマイクロエマルジョンの平均粒子径は 5.9 nm であり、1.5 ~ 20.3 nm の範囲に 100% の粒度分布を持っていた。次に、図 4 は吸収実験の結果である。図 4 のとおりエレクトロポレーションとマイクロエマルジョンを併用した実施例 1-1 及び実施例 1-2 においては、血清中カルシウム濃度はともに 2 時間経過時まで投与前の 69% まで低下している。これに対して、比較例 1-1 すなわちマイクロエマルジョン単独では 77%、比較例 1-2 すなわちエレクトロポレーション単独では 84% までしか低下しなかった。これはエレクトロポレーションとマイクロエマルジョンの併用により、エレクトロポレーション単独又はマイクロエマルジョン単独に比べて、sCT の吸収が相乗的に促進されたためである。

【0027】〔実験例 2〕

《実施例 2-1》前記実施例 1-1 の結果を用いた。ここで使用したマイクロエマルジョンの平均粒子径は 5.9 nm である。

《比較例 2-1》エレクトロポレーションと粒径の大きいマイクロエマルジョンの併用による sCT の投与

(3)

〈マイクロエマルジョンの調製〉サーモンカルシトニン（sCT、NOVA）1mg を牛血清アルブミンを含む pH3 のクエン酸緩衝液（1%BSA/CB 緩衝液）50 μ l に溶解させて sCT 溶液を調製した。この sCT 溶液 20 μ l にジグリセリンモノオレイン酸エステル（DGM O、日光ケミカル社製、商品名）を 80mg を加え、さらに中鎖脂肪酸トリグリセライド（パナセート 810、日本油脂社製、商品名）880mg を混合した後、超音波を 5 分間適用し、sCT 封入マイクロエマルジョンを調製した。マイクロエマルジョンの粒子径をレーザー光散乱法により測定した結果、平均粒子径 4.3 μ m であった。

【0028】〈吸収実験〉SD ラットをウレタン麻酔下、バリカンとシェイバーにて腹部除毛後、腹部に生理食塩水 200 μ l を滴下し、図 1 に示す電極を用いて 2 回通電（1KV/cm、25 μ FD）した。通電後、直ちに生理食塩水を拭き取り、上記 sCT 封入マイクロエマルジョン（平均粒子径 4.3 μ m）200 μ l を腹部に適用した。このマイクロエマルジョン適用後、経時的に頸静脈から採血し、遠心分離後血清を得た。次いで、市販のカルシウム測定キット（カルシウム C テストワコー、和光純薬社製）を使用して吸光度法（UV：570 nm）により血清中のカルシウム濃度を測定し、薬物投与前の血清中カルシウム濃度と比較した。図 5 はその結果である。

【0029】〈試験結果〉前記のとおり実施例 2-1 で

用いたマイクロエマルジョンの平均粒子径は5.9nmであり、他方比較例2-1で使用したマイクロエマルジョンは白濁しており、その平均粒子径は4.3μmである。図5のとおり、このように粒子径が異なるマイクロエマルジョンを用いた吸収実験の結果、実施例2-1すなわちエレクトロポレーションとマイクロエマルジョン（平均粒子径：5.9nm）とを併用した場合には、血清中カルシウム濃度は2時間経過時までに投与前の69%まで低下した。これに対して、比較例2-1すなわちエレクトロポレーションとエマルジョン（平均粒子径：4.3μm）の併用では、血清中カルシウム濃度は2時間経過時までに投与前の90%までしか低下しなかった。

【0030】この事実は、粒子径の小さいマイクロエマルジョンの場合には、エレクトロポレーションにより形成された非常に小さい孔を透過することができ、そこに封入されたsCTがSDラット体内に吸収されるために*

*血清中のカルシウム濃度が低下するが、粒子径のやや大きいエマルジョンを用いるとエレクトロポレーションによる形成された孔を透過させることができないため、sCTも吸収されず、血清中のカルシウム濃度もほとんど低下しないことを示している。本実験例によりエレクトロポレーションと組み合わせられるマイクロエマルジョンの粒子径の重要性が確認された。

【0031】（実験例3）以下に示す処方でマイクロエマルジョン製剤を調製した。マイクロエマルジョンの粒子径は実施例1-1と同様に測定した。

《実施例3-1》下記表1の各成分を混合してマイクロエマルジョンを得た。このマイクロエマルジョンの平均粒子径は25nmであった。図2のマイクロエマルジョン保持層として不織布を使用し、そこにマイクロエマルジョンを含浸させてエレクトロポレーション用製剤を調製した。

【表 1】

成 分 の 種 類	量
ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油（エチレン鎖20）	4 g
モノオレイン酸ジグリセリル	4 g
インスリン含有リン酸緩衝液（インスリン量：1mg、pH5）	2 g
大豆油	45 g

【0032】《実施例3-2》下記表2の各成分を混合してマイクロエマルジョンを得た。このマイクロエマルジョンの平均粒子径は30nmであった。図2のマイクロエマルジョン保持層としてカルボキシルメチルセルロース※

※一スナトリウムゲルを用い、そこにマイクロエマルジョンを分散させてエレクトロポレーション用マイクロエマルジョン製剤を調製した。

【表 2】

成 分 の 種 類	量
ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油（エチレン鎖20モル）	2 g
ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油（エチレン鎖10モル）	5 g
エルスロポイチン水溶液（エルスロポイチン量：500μg）	1 g
トリ脂肪酸グリセリンエステル	45 g

【0033】《実施例3-3》下記表3の各成分を混合してマイクロエマルジョンを得た。このマイクロエマルジョンの平均粒子径は45nmであった。図2のマイクロエマルジョン保持層としてセルロースアセテート膜を★

★用い、そこにマイクロエマルジョンを含浸させてエレクトロポレーション用マイクロエマルジョン製剤を調製した。

【表 3】

成 分 の 種 類	量
ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油（エチレン鎖20モル）	2 g
ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油（エチレン鎖10モル）	5 g
クエン酸フェンタニル水溶液（クエン酸フェンタニル量：50μg）	1 g

【0034】

【発明の効果】本発明は、エレクトロポレーションによ

り皮膚や粘膜に透過ルートの孔を生じさせ、そこから吸収性のよい粒子径の小さいマイクロエマルジョンに封入

11

した薬物を吸収させることにより、従来技術に比べ高い薬効を得ることができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 エレクトロポレーション用電極の例を示す図。

【図 2】 エレクトロポレーション用マイクロエマルジョン剤の使用態様を示す例。

【図 3】 実施例 1-1（比較例 1-1 も同じ）で調製したマイクロエマルジョンの粒度分布を示す図。

【図 4】 実験例 1 における薬物投与前の血清中カルシウム濃度に対する薬物投与後の血清中カルシウムの割合

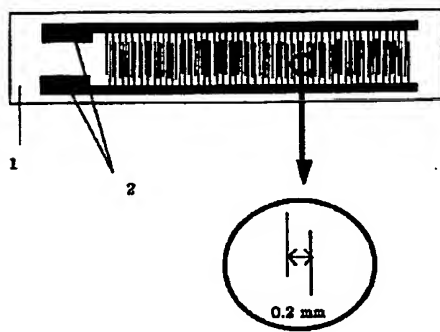
(%) を示す図。

【図 5】 実験例 2 における薬物投与前の血清中カルシウム濃度に対する薬物投与後の血清中カルシウムの割合 (%) を示す図。

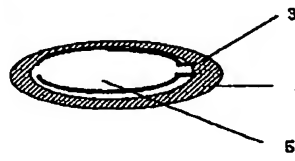
【符号の説明】

- 1 絶縁性高分子フィルム
- 2 電極
- 3 電極
- 4 粘着層
- 10 5 マイクロエマルジョン保持層

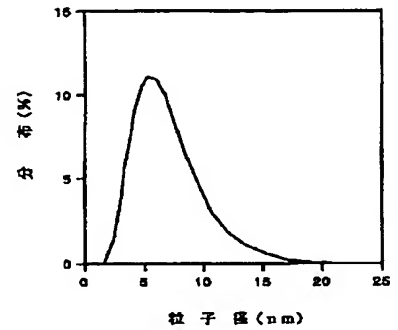
【図 1】



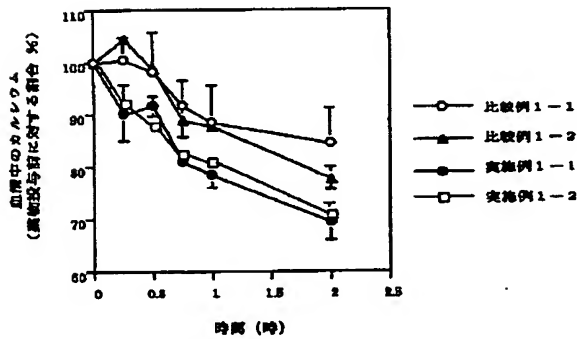
【図 2】



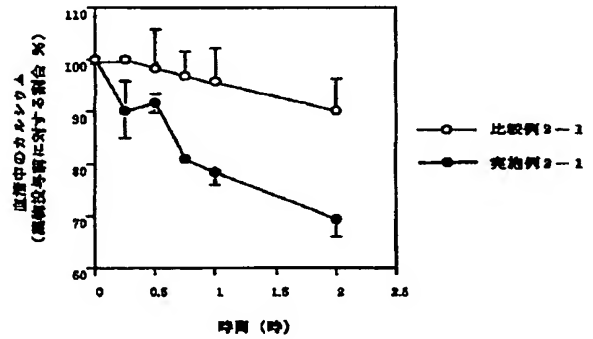
【図 3】



【図 4】



【図 5】



*** NOTICES ***

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS**[Claim(s)]**

[Claim 1] Micro emulsion pharmaceutical preparation for electroporation which is the micro emulsion pharmaceutical preparation for electroporation, and is characterized by a micro emulsion coming to contain the aqueous phase, an oil phase, a surfactant, and a drug.

[Claim 2] Micro emulsion pharmaceutical preparation for electroporation according to claim 1 which is the micro emulsion which has 90% or more of particle size distribution in the range whose particle diameter of the above-mentioned micro emulsion is 0.1nm - 100nm.

[Claim 3] Micro emulsion pharmaceutical preparation for electroporation according to claim 1 which is the micro emulsion which has 90% or more of particle size distribution in the range whose particle diameter of the above-mentioned micro emulsion is 0.1nm - 50nm.

[Claim 4] Micro emulsion pharmaceutical preparation for electroporation according to claim 1, 2, or 3 whose aqueous phase of the above-mentioned micro emulsion is aqueous phase chosen from water, the buffer solution, and the water solution of a salt.

[Claim 5] Micro emulsion pharmaceutical preparation for electroporation according to claim 1, 2, or 3 whose oil phase of the above-mentioned micro emulsion is an oil phase chosen from vegetable oil, animal oil, saturated fatty acid ester, unsaturated fatty acid ester, and medium-chain-fatty-acid ester.

[Claim 6] Micro emulsion pharmaceutical preparation for electroporation according to claim 1, 2, or 3 which is a surfactant which the surfactant of the above-mentioned micro emulsion comes to mix the surfactant and ionic surfactant of HLB 3-7, or comes to mix the surfactant of HLB 3-7, and the surfactant of HLB 10-20.

[Claim 7] Micro emulsion pharmaceutical preparation for electroporation according to claim 1, 2, 3, 4, 5, or 6 which is the micro emulsion which the drug of the above-mentioned micro emulsion comes to contain in the aqueous phase.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to the micro emulsion pharmaceutical preparation for electroporation which uses a drug and a physiological active substance in the approach of prescribing for the patient to the living body by using electroporation and a micro emulsion together in more detail about the micro emulsion pharmaceutical preparation for electroporation used in a medical field.

[0002]

[Description of the Prior Art] Electroporation is the approach conventionally used for

installation of a gene, and is an approach into which carry out the load of the high voltage to a cell in an instant, and intracellular DNA etc. is made to introduce. In recent years, transderma and to pass and to apply to delivery of the drug from membrane are tried in this technique [***** No. 502416 [three to], Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 90:10504-10508 (1993)]. Although the hole which is the new reversible root was formed to the skin or membrane in electroporation and this hole was used for delivery of a drug, the drug of amount sufficient in independent use of electroporation was not able to be sent.

[0003] On the other hand, the micro emulsion was obtained for the first time by Hoar etc. in 1943, and is a clear liquid with it. [remarkable particle diameter and] [small] In recent years, the absorption from an alimentary canal encloses a bad peptide etc. with this micro emulsion, and the method of promoting that absorption is studied (JP,7-2689,A). A micro emulsion is a stabilization particle with a several nm · hundreds of nm (nm= nano meter) diameter, and is the drug carrier who can enclose a drug into it. According to this, it has a certain amount of absorption facilitatory effect through the skin or membrane, but if there is no hole in the skin and membrane which you are going to make it absorb, it will not be absorbed, but it has come to make sufficient quantity of a drug absorb from the skin or membrane.

[0004] Thus, when a drug was sent from the skin or membrane, as for transparency of the drug from the skin or membrane, an electroporation independent and a micro emulsion independent are inadequate, and sufficient drug effect was not able to be obtained. such a situation [in / in this invention person / the conventional technique], and a trouble -- taking an example -- various kinds -- since it be various, when experiment and examination be advanced, while enclosing the drug and the physiological active substance (this detail in the letter and both be double, and a designation be suitably carry out to a "drug") with the micro emulsion, the reversible hole be formed in the skin or membrane by electroporation, and the new and useful approach of sending a drug effectively in the living body be found out by sending a micro emulsion from the hole.

[0005]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] That is, this invention can increase the delivery effectiveness of a drug in multiplication compared with the case where this applies electroporation or a micro emulsion independently, respectively for the purpose of offering the micro emulsion pharmaceutical preparation for electroporation faced and used for using electroporation and a micro emulsion together.

[0006]

[Means for Solving the Problem] This invention is the micro emulsion pharmaceutical preparation for electroporation, and offers the micro emulsion pharmaceutical preparation for electroporation with which a micro emulsion comes to contain the aqueous phase, an oil phase, a surfactant, and a drug.

[0007]

[Embodiment of the Invention] Although a hole is formed to the skin or membrane in electroporation, only now, a transparency facilitatory effect cannot be desired to the skin or the low drug of membrane permeability, and sufficient amount cannot be sent. by medicating with micro emulsion pharmaceutical preparation the part which applied electroporation in this invention, absorption of the drug to the inside of the body is boiled markedly, and is increased. The particle diameter of the micro emulsion pharmaceutical preparation concerning this invention has 90% or more of particle size distribution in the range of 0.1nm · 100nm preferably, and has 90% or more of particle size distribution in the range whose particle diameter is 0.1nm · 50nm still more preferably.

[0008] Namely, even if the particle diameter is too large, it cannot penetrate the hole

formed of electroporation, if too conversely small, cannot perform micro emulsion-ization suitable for electroporation, or may not have formed it into a micro emulsion. Apertures in which it is reversibly formed although the sizes of the hole formed of electroporation differ more how, such as an application electrical potential difference and an application site, are considered to be a maximum of about 100nm. For this reason, as for the particle diameter of a micro emulsion, it is desirable that it is about 0.1-100nm. Moreover, since the hole formed in the bottom of a condition with comparatively little electrical stimulation becomes still smaller, as for the particle diameter of a micro emulsion, it is desirable that it is about 0.1-50nm in this case.

[0009] As an application mode of the micro emulsion pharmaceutical preparation for electroporation of this invention (1) After applying electroporation once [at least] to the skin or membrane, Make the part absorb a drug with the application of micro emulsion pharmaceutical preparation. (2) After applying micro emulsion pharmaceutical preparation to the skin or membrane, Make the same part absorb a drug with the application of electroporation once [at least]. (3) It can consider as the pharmaceutical preparation which made the micro emulsion the electrode for electroporation, and one, and can carry out by the various technique of applying electroporation and a micro emulsion to coincidence. These (1) It does not interfere, even if it applies electroporation how many times with time after that in any case of the mode of (3).

[0010] Drawing 1 is drawing showing an example of the electrode for electroporation which may be used in the mode of (1) - (2) especially among such application modes. Among drawing 1, 1 is an insulating high polymer film and 2 is a pair of the electrodes, two or more thin lines keep spacing by turns between two electrodes as illustration, and one is arranged. Spacing of the thin line is about 0.2mm as the enlarged drawing in drawing 1 shows it as an example. After making the electrode surface contact the skin and membrane on the occasion of use of this electrode, power which is stated to inter-electrode below is applied.

[0011] As an electrode for electroporation which applies the pharmaceutical preparation of this invention, any of polarizability and non-polarizability are sufficient. Moreover, as an electrical potential difference, it is applicable in the range of 10 - 2000 V/cm, and if the electrical stimulation to the skin is taken into consideration, it will be preferably applied in the range of 50 - 1000 V/cm. Although there is especially no limitation as an energization pattern, it is desirable that they are a characteristic pair number form wave or a rectangle type wave. If electroporation is energized once or more, effectiveness will be seen, but the effectiveness increases, so that there are many counts. In consideration of a feeling of electrical irritation, it is desirable that the energizing time is the range of 0.1 microseconds - 5 seconds as a tau value (time amount until tau applies and an electrical potential difference declines to about 37%) in the case of an exponential, logarithmic wave, and the range of about 0.1 microsecond - 100m second in the case of a square wave.

[0012] It is good also as pharmaceutical preparation which made the micro emulsion the electrode for electroporation, and one as it sticks in the form where the micro emulsion was infiltrated to porous membrane to the skin or membrane as an application gestalt of the micro emulsion pharmaceutical preparation for electroporation concerning this invention, or it could carry out like an emulsion or lotions and you could apply while it has been liquefied, and further shown in drawing 2. Especially this electrode one apparatus pharmaceutical preparation is suitably used, when applying in the mode of (3) among said application mode (1) - (3).

[0013] As for drawing 2, 3 is an electrode, 4 is an adhesive layer and 5 is a micro emulsion maintenance layer. Film (for example, 6 and 6-nylon, a cellulose, cellulose acetate, polyvinylidene fluoride, etc.) made from a nonwoven fabric or various macromolecules as this micro emulsion maintenance layer 5 can be used, or the polymer

gel of gelatin, an agar, polyvinyl alcohol gel, sodium polyacrylate, the sodium carboxymethyl cellulose, and others may be used. The micro emulsion of this invention is held into these maintenance layer, and it is held.

[0014] The micro emulsion in this invention contains the surfactant of the aqueous phase, an oil phase, and some kinds, and is constituted. As a class of surfactant, HLB uses combining the nonionic surfactant and ionic surfactant of 3-7, or the nonionic surfactant and HLB of 3-7 use [HLB] it combining the nonionic surfactant of 10-20. As the blending ratio of each [these] component, about the aqueous phase, it is 5 - 15% of range still more preferably 1 to 20% preferably 0.0001 to 30% (it is below the same% of the weight), and a surfactant is used in 50 - 99% of range about 0.0001 - 20% of range, and an oily component.

[0015] Although there is especially no limitation as the above-mentioned aqueous phase, the water solution which contains salts, such as the buffer solutions, such as ** water, ** phosphate buffer solution, citrate buffer solution, the carbonic acid buffer solution, and the acetic acid buffer solution, ** sodium chloride, potassium chloride, and a sodium sulfate, preferably can be mentioned, and a drug is dissolved in these. Moreover, although there is especially no limitation as an oil phase, the monochrome of soybean oil, desirable sesame oil and desirable vegetable oil like olive oil or animal edible oil (fatty acid glycerol ester), saturation or unsaturated fatty acid, and medium chain fatty acid (C5 - C18), JI, and triglycerol ester can be mentioned.

[0016] Moreover, although there is especially no limitation as the above-mentioned ionic surfactant, the G 2-ethylhexyl sodium succinate, sodium alkylsulfate (an alkyl part C8-C20, preferably C10- C14), etc. are mentioned, for example. Moreover, HLB is mentioned for polyoxyethylene hardening or non-hydrogenated castor oil (the number of polyoxyethylene average addition mols is 30-80), polyoxyethylene-glycol higher-fatty acid ester (a fatty acid is a fatty acid of C16-C20 of saturation or partial saturation, and the number of addition mols of an average of ethylene glycol is 10-40), polyoxyethylene alkyl ether (alkyl parts are C8 - C14, and the number of oxyethylene average addition mols is 4-25), etc. as a nonionic surfactant of 10-20.

[0017] HLB moreover, as a nonionic surfactant of 3-7 Monochrome or polyglyceryl fatty acid ester (a fatty acid is a fatty acid of C18-C20 of saturation or partial saturation) The numbers of fatty acid addition mols per one mol of glycerols are 1-2. The number of addition mols of a glycerol further 0-4, A sorbitan fatty acid ester (a fatty acid is C16-C20 of partial saturation, and the number of addition mols is 1-3), polyoxyethylene hardening, or non-hydrogenated castor oil (the number of oxyethylene average addition mols is 3-20) is mentioned.

[0018] As a drug furthermore used in the pharmaceutical preparation of this invention For example, morphine, fentanyl, a pethidine, codeine, buprenorphine, Central analgesic one and insulins, such as butorphanol, EPUTAZOSHIN, and pentazocine, Calcitonin, a calcitonin related gene peptide, vasopressin, Desmopressin, protireline (TRH), adrenocorticotrophin (ACTH), A luteinizing hormone releasing factor (LH-RH), growth hormone releasing hormone (GRH), A nerve growth factor (NGF) and other stripping factors, angiotensin (angiotensin), Subthyroid hormone (PTH), thyrotropic hormone (TSH, silo tropine), Follicle-stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), prolactin, Blood serum ***** tropic hormones, choriogonadotropin (HCG), a human menopausal gonadotrophin hormone (HMG), A growth hormone, somatostatin, somatomedin, glucagon, oxytocin, Gastrin, secretin, an endorphin, enkephalin, a cholest kinin, Endothelin, neurotensin, interferon, interleukin, Transferrin, erythropoietin, super-oxide dismutase (SOD), A granulocyte stimulator (G-CSF), an intestinal tract vasodilatation peptide (VIP), Peptides, such as a muramyl dipeptide, corticotropin, urogastrone, and a Homo sapiens atrial urination peptide (h-ANP) Ataraxics, such as karma BAZEPIN, chlorpromazine, diazepam, and nitrazepam, Although sex hormone,

such as antihypertensives, such as strong *****s, such as antineoplastic drugs, such as PUREO mycin, ADOREA mycin, 5-fluorouracil, and a mitomycin, digitalis, digoxin, and digitoxin, reserpine, and clonidine, estradiol, and a testosterone, etc. is mentioned It will be used if it is not only these but transderma, and the thing through which it passes and which can be sent by membrane.

[0019]

[Example] Hereafter, although the example of this invention is explained based on the example 1 of an experiment - the example 3 of an experiment, of course, this invention is not limited by these examples. the example 1 of an experiment -- setting -- administration of salmon calcitonin (sCT) -- an example -- carrying out -- the combined effect of electroporation and a micro emulsion, and electroporation -- independent or a micro emulsion -- independent effectiveness was compared. Moreover, in the example 2 of an experiment, drug effect with the case where sCT is enclosed with the case where sCT is enclosed with the micro emulsion whose mean particle diameter is 5.9nm, and a 4.3-micrometer emulsion was investigated. The mean particle diameter of the example of the formula which furthermore combined various drugs and micro emulsions in the example 3 of an experiment, and pharmaceutical preparation, and the micro emulsion at that time was shown.

[0020] [The example 1 of an experiment]

<<example 1-1>> Administration of sCT by concomitant use of electroporation and a micro emulsion (1)

<Preparation of a micro emulsion> Salmon calcitonin (sCT, NOVA) 1mg was dissolved in 50micro of water solutions 1 of cow serum albumin (1%BSA), and the sCT solution was prepared. On the other hand, 100mg [of diglycerol mono-oleate] (DGMO, daylight chemical company make, trade name) and medium-chain-fatty-acid triglyceride (PANASETO 810, Nippon Oil & Fats Co., Ltd. make, trade name) 1760mg was mixed to 140mg (Pelex OTP, the Kao Corp. make, trade name) of sulfo succinic-acid mold anionic surface active agents, and surfactant oil was prepared. In this way, obtained 20micro of sCT solutions 1 and 980micro of surfactant oil 1 were mixed, and the sCT enclosure micro emulsion was prepared. The particle diameter of a micro emulsion was measured with laser light scattering measurement (equipment used = it is the same a laser-light-scattering particle-size-distribution measuring device, DLS[by the Otsuka electronic company]-7000 mold, 75mW of Ar laser outputs, and the following).

[0021] <Absorption experiment> 200micro of physiological salines 1 was dropped at the abdomen after abdomen depilating with hair clipper and a shaver under urethane anesthesia, and energization (1 kV/cm, 25microFD) of the Sprague-Dawley rat was carried out twice using the electrode shown in drawing 1 . After energization, immediately, the physiological saline was wiped off and 200microl of the sCT enclosure micro emulsion prepared as above-mentioned was applied to this abdomen. After application of a micro emulsion, it collected blood from the jugular vein with time, centrifugal separation was carried out, and the blood serum was obtained. Subsequently, the calcium concentration in a blood serum was measured with the extinction method (UV:570nm) using the commercial calcium measurement kit (calcium C Test Wako, the Wako Pure Chem make, trade name), and it compared with the calcium concentration in the blood serum before medication.

[0022] <<example 1-2>> Administration of sCT by concomitant use of electroporation and a micro emulsion (2)

<Preparation of a micro emulsion> Salmon calcitonin (sCT, NOVA) 1mg was dissolved in 50micro [of citrate buffer solution of pH3 containing cow serum albumin] (1%BSA/CB buffer solution) 1, and the sCT solution was prepared. On the other hand, 160mg [of diglycerol mono-oleate] (DGMO, daylight chemical company make, trade name) and medium-chain-fatty-acid triglyceride (PANASETO 810, Nippon Oil & Fats

Co., Ltd. make, trade name) 1760mg was mixed to polyoxyethylene (number of average addition mols = 20) mono-oleic acid sorbitan (made in Nikko Chemicals) 80mg, and surfactant oil was prepared. In this way, obtained 20micro of sCT solutions 1 and 980micro of surfactant oil 1 were mixed, and the sCT enclosure micro emulsion was prepared. When the particle diameter of this micro emulsion was measured with laser light scattering measurement, it was 30.5nm in mean particle diameter.

[0023] <Absorption experiment> 200micro of physiological salines 1 was dropped at the abdomen after abdomen depilating with hair clipper and a shaver under urethane anesthesia, and energization (1 kV/cm, 25microFD) of the Sprague-Dawley rat was carried out twice using the electrode shown in drawing 1 . After energization, the physiological saline was wiped off immediately and 200microl of the above-mentioned sCT enclosure micro emulsion was applied to this abdomen. After application of a micro emulsion, it collected blood from the jugular vein with time, centrifugal separation was carried out, and the blood serum was obtained. Subsequently, the calcium concentration in a blood serum was measured with the extinction method (UV:570nm) using the commercial calcium measurement kit (calcium C Test Wako, the Wako Pure Chem make, trade name), and it compared with the calcium concentration in the blood serum before medication.

[0024] Example of <<comparison 1-1>> 200micro of physiological salines 1 was dropped for the administration <absorption experiment> Sprague-Dawley rat of sCT by the micro emulsion at the abdomen after abdomen depilating with hair clipper and a shaver under urethane anesthesia, the physiological saline was wiped off immediately, and sCT enclosure micro emulsion 200microl prepared in the example 1-1 was applied to this abdomen. After micro emulsion application, it collected blood from the jugular vein with time, centrifugal separation was carried out, and the blood serum was obtained. Calcium concentration in a blood serum was measured like the example 1-1 - the example 1-2.

[0025] Example of <<comparison 1-2>> Administration <preparation of sCT solution> salmon calcitonin (sCT, NOVA) 1mg of sCT by electroporation was dissolved in 50micro of water solutions 1 of cow serum albumin (1%BSA), and the sCT solution was prepared. 20micro of these sCT(s) solutions 1 and 980micro of 1%BSA solutions 1 were mixed, and the sCT solution was prepared.

<Absorption experiment> 200micro of physiological salines 1 was dropped at the abdomen after abdomen depilating with hair clipper and a shaver under urethane anesthesia, and energization (1 kV/cm, 25microFD) of the Sprague-Dawley rat was carried out twice using the electrode shown in drawing 1 . The physiological saline was immediately wiped off after energization and 200microl was applied for the sCT solution to the abdomen. After administration, it collected blood from the jugular vein with time, centrifugal separation was carried out, and the blood serum was obtained. Calcium concentration in a blood serum was measured like the example 1-1 - the example 1-2.

[0026] <Test-result> drawing 3 is drawing showing the particle size distribution of the micro emulsion prepared in the example 1-1. The same micro emulsion is used also in the example 1-1 of a comparison as aforementioned. The mean particle diameter of the micro emulsion used in the example 1-1 and the example 1-1 of a comparison as drawing 3 is 5.9nm, and had 100% of particle size distribution in the range of 1.5-20.3nm. Next, drawing 4 is as a result of an absorption experiment. In the example 1-1 and example 1-2 which used electroporation and a micro emulsion together as drawing 4 , both the calcium concentration in a blood serum is falling to 69% before administration by the time of 2-hour progress. On the other hand, it fell only to 84% in the example 1-2 of a comparison, i.e., an electroporation independent, 77% at the example 1-1 of a comparison, i.e., a micro emulsion independent. This is because

absorption of sCT was promoted in multiplication by concomitant use of electroporation and a micro emulsion compared with an electroporation independent or a micro emulsion independent.

[0027] [The example 2 of an experiment]

<<example 2-1>> The result of said example 1-1 was used. The mean particle diameter of the micro emulsion used here is 5.9nm.

Example of <<comparison 2-1>> Administration of sCT by concomitant use of electroporation and a micro emulsion with a large particle size (3)

<Preparation of a micro emulsion> Salmon calcitonin (sCT, NOVA) 1mg was dissolved in 50micro [of citrate buffer solution of pH3 containing cow serum albumin] (1%BSA / CB buffer solution) 1, and the sCT solution was prepared. After adding 80mg for diglycerol mono-oleate (DGMO, daylight chemical company make, trade name) to 20micro of this sCT solution 1 and mixing medium-chain-fatty-acid triglyceride (PANASETO 810, Nippon Oil & Fats Co., Ltd. make, trade name) 880mg further, the supersonic wave was applied for 5 minutes and the sCT enclosure micro emulsion was prepared. As a result of measuring the particle diameter of a micro emulsion with laser light scattering measurement, it was 4.3 micrometers in mean particle diameter.

[0028] <Absorption experiment> 200micro of physiological salines 1 was dropped at the abdomen after abdomen depilating with hair clipper and a shaver under urethane anesthesia, and energization (1 kV/cm, 25microFD) of the Sprague-Dawley rat was carried out twice using the electrode shown in drawing 1 . After energization, the physiological saline was wiped off immediately and the above-mentioned sCT enclosure micro emulsion (mean particle diameter of 4.3 micrometers) 200microl was applied to the abdomen. After this micro emulsion application, it collected blood from the jugular vein with time, and the after [centrifugal separation] blood serum was obtained. Subsequently, the calcium concentration in a blood serum was measured with the extinction method (UV:570nm) using the commercial calcium measurement kit (calcium C Test Wako, Wako Pure Chem make), and it compared with the calcium concentration in a blood serum before medication. As a result, drawing 5 is.

[0029] <Test result> The mean particle diameter of the micro emulsion used in the example 2-1 as aforementioned is 5.9nm, the micro emulsion used in the example 2-1 of an another side comparison is cloudy, and the average ***** is 4.3 micrometers. When an example 2-1, i.e., electroporation, and a micro emulsion (mean particle diameter: 5.9nm) were used together as a result of the absorption experiment using the micro emulsion from which particle diameter differs in this way as drawing 5 , the calcium concentration in a blood serum fell to 69% before administration by the time of 2-hour progress. On the other hand, in concomitant use of the example 2-1 of a comparison, i.e., electroporation, and an emulsion (mean particle diameter: 4.3 micrometers), the calcium concentration in a blood serum fell only to 90% before administration by the time of 2-hour progress.

[0030] In the case of a micro emulsion with small particle diameter, since sCT which could penetrate the very small hole formed of electroporation, and was enclosed there is absorbed by the Sprague-Dawley-rat inside of the body, the calcium concentration in a blood serum falls, but this fact Since the formed hole by electroporation cannot be made to penetrate if a little large emulsion of particle diameter is used, sCT is not absorbed, either but it is shown that the calcium concentration in a blood serum hardly falls, either. The importance of the particle diameter of the micro emulsion combined with electroporation by this example of an experiment was checked.

[0031] [Example 3 of an experiment] Micro emulsion pharmaceutical preparation was prepared by the formula shown below. The particle diameter of a micro emulsion was measured like the example 1-1.

<<example 3-1>> Each component of the following table 1 was mixed and the micro

emulsion was obtained. The mean particle diameter of this micro emulsion was 25nm. The nonwoven fabric was used as a micro emulsion maintenance layer of drawing 2, the micro emulsion was infiltrated there, and the pharmaceutical preparation for electroporation was prepared.

[Table 1]

成 分 の 種 類	量
ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油 (エチレン鎖20)	4 g
モノオレイン酸ジグリセリル	4 g
インスリン含有リン酸緩衝液 (インスリン量: 1 mg、pH5)	2 g
大豆油	45 g

[0032] <<example 3-2>> Each component of the following table 2 was mixed and the micro emulsion was obtained. The mean particle diameter of this micro emulsion was 30nm. Using sodium carboxymethyl-cellulose gel as a micro emulsion maintenance layer of drawing 2, the micro emulsion was distributed there and the micro emulsion pharmaceutical preparation for electroporation was prepared.

[Table 2]

成 分 の 種 類	量
ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油 (エチレン鎖20モル)	2 g
ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油 (エチレン鎖10モル)	5 g
エルスロポイチン水溶液 (エルスロポイチン量: 500 μ g)	1 g
トリ脂肪酸グリセリンエステル	45 g

[0033] <<example 3-3>> Each component of the following table 3 was mixed and the micro emulsion was obtained. The mean particle diameter of this micro emulsion was 45nm. Using cellulose acetate membrane as a micro emulsion maintenance layer of drawing 2, the micro emulsion was infiltrated there and the micro emulsion pharmaceutical preparation for electroporation was prepared.

[Table 3]

成 分 の 種 類	量
ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油 (エチレン鎖20モル)	2 g
ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油 (エチレン鎖10モル)	5 g
クエン酸フェンタニル水溶液 (クエン酸フェンタニル量: 50 μ g)	1 g

[0034]

[Effect of the Invention] This invention can obtain high drug effect compared with the conventional technique by making the skin and membrane produce the hole of the transparency root by electroporation, and making the drug enclosed with the micro

emulsion with the good small particle diameter of absorptivity from there absorb.

DESCRIPTION OF DRAWINGS

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] Drawing showing the example of the electrode for electroporation.

[Drawing 2] The example which shows the use mode of the micro emulsion pharmaceutical preparation for electroporation.

[Drawing 3] Drawing showing the particle size distribution of the micro emulsion prepared in the example 1-1 (the same is said of the example 1-1 of a comparison).

[Drawing 4] Drawing of the calcium in a blood serum after the medication to the calcium concentration in a blood serum before the medication in the example 1 of an experiment showing (%) comparatively.

[Drawing 5] Drawing of the calcium in a blood serum after the medication to the calcium concentration in a blood serum before the medication in the example 2 of an experiment showing (%) comparatively.

[Description of Notations]

1 Insulating High Polymer Film

2 Electrode

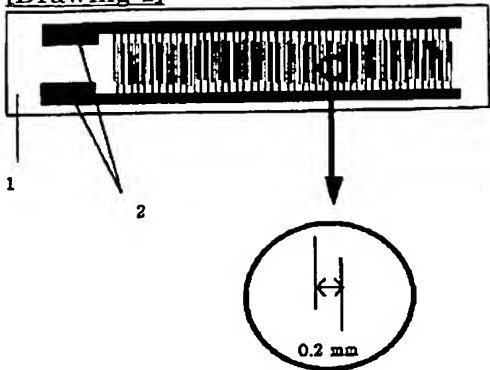
3 Electrode

4 Adhesive Layer

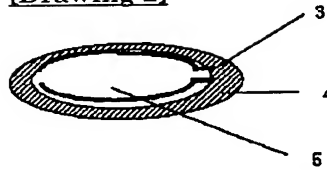
5 Micro Emulsion Maintenance Layer

DRAWINGS

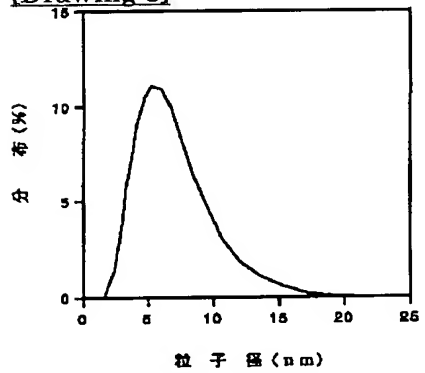
[Drawing 1]



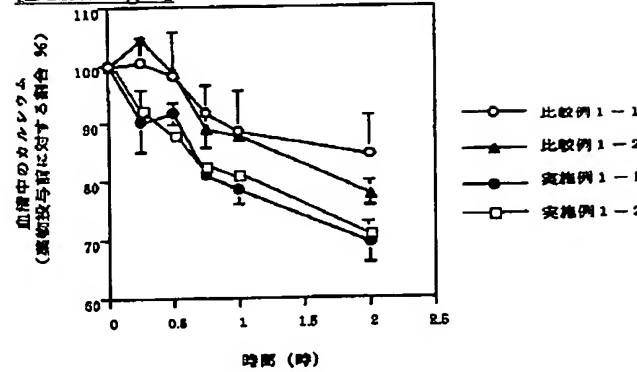
[Drawing 2]



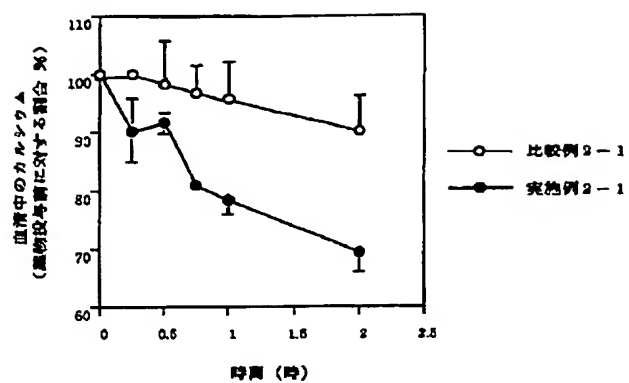
[Drawing 3]



[Drawing 4]



[Drawing 5]



[Translation done.]